

АСЕПТИЧЕСКАЯ СРЕДА СОДЕРЖАНИЯ АСКАРИД
(*ASCARIS SUUM*) IN VITRO

И. А. Пушкарев, М. А. Лаздыня и Х. Я. Грант

Институт биологии АН Латвийской ССР и Рижский медицинский институт

При бактериальном исследовании среды, в которой содержались аскариды (*Ascaris suum*), выделены *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris* и *Enterococcus* sp. Для подавления микрофлоры в среде содержания в кишечном тракте аскарид целесообразно применять колимицин вместе с мицерином и нистатином. Такая комбинация на 100% обеспечивает стерильность среды и на 90% стерильность кишечника культивируемых аскарид.

В последние десятилетия в поисках новых эффективных средств по борьбе с эндопаразитами человека и животных широко развиваются физиологические и биохимические исследования гельминтов. Такие исследования выдвигают задачу усовершенствования методов содержания гельминтов *in vitro*. Для этого применяются как солевые, так и углеводно-солевые среды (Baldwin, 1943; Baldwin and Moyle, 1947; Erps et al., 1950; Бенедиктов, 1962). В целях удлинения сроков сохранения физиологической активности и выживания аскарид некоторые авторы в солевую среду вводят и другие питательные добавки — аминокислоты и витамины (Ellison et al., 1960).

Аскариды, полученные на бойне от свиней, как правило, содержат микробы. При содержании аскарид в искусственных условиях микробы переходят в среду и размножаются, среда мутнеет. Микробы потребляют углеводы и выделяют продукты своего метаболизма; снижается pH среды. Под влиянием микрофлоры уменьшаются сроки выживаемости аскарид (Ishizaki et al., 1958). В связи с этим возникает необходимость асептического содержания аскарид.

При изучении конечных продуктов метаболизма, выделяемых аскаридами, необходимо добиться полной стерильности как среды содержания, так и аскарид. Известно, что летучие жирные кислоты, образующиеся в результате углеводного обмена аскарид, выделяются в среду и многими микроорганизмами (Erps et al., 1950; Bueding and Most, 1953). По литературным данным, *Escherichia coli* наряду с этиловым спиртом продуцирует муравьиную и уксусную кислоты (Growe et al., 1929, 1930), а *Pseudomonas aeruginosa* выделяет муравьиную, уксусную и пропионовую кислоты (Bernhauer, 1932).

Микробиологические исследования показали, что в среде содержания и в самих свиных аскаридах обычно присутствуют грам-отрицательные, грам-положительные кокки и грам-отрицательные палочки (Erps et al., 1950; Cavier, Savel, 1953; Грант, Лаздыня, Пушкарев, 1965). Кроме того, обнаружены грибки из группы дрожжей и *Monilia* (Ishizaki, Bando and Kobayashi, 1958). Весьма интересные данные получены при микробиологическом изучении аскарид из тонких кишок человека (Araullo-Cruz, 1965). Из аскарид выделено несколько бактериальных культур и *Escherichia coli* (85% всех проверенных гельминтов). Чтобы предотвратить развитие микроорганизмов при содержании аскарид, Кавье и Са-

вель (Cavier and Savel, 1953) и Бенедиктов (1962) рекомендуют помещать аскарид в среду с исходной щелочной реакцией. Однако такое мероприятие не дает желаемых результатов. Ряд авторов для создания стерильных условий содержания аскарид к среде добавляли антибиотики. Чаще всего для подавления микробов использовались пенициллин и стрептомицин (Epps et al., 1950; Ishizaki et al., 1958; Saz and Gerzon, 1962; Ueno, 1960; Ellison et al., 1960) и для грибов — дегидроацетовая кислота (Ueno, 1960; Ishizaki et al., 1958) или нистатин (Ellison et al., 1960; Saz and Gerzon, 1962). Предварительные данные, полученные нами из небольшого числа опытов (Грант, Лаздыня, Пушкарев, 1965), показали, что пенициллин и стрептомицин мало эффективны для асептического содержания аскарид. Наилучшие результаты были получены при применении колимицина или мицерина вместе с нистатином.

Целью настоящей работы был подбор эффективной комбинации антибиотиков для подавления микроорганизмов в среде и в кишечном тракте аскарид при их содержании *in vitro*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Аскарид (*Ascaris suum* Goeze, 1782) собирали на мясокомбинате из содержимого кишечника свиней. В теплом физиологическом растворе (36—37°) их доставляли в лабораторию. С момента сбора аскарид до доставки их в лабораторию проходило не более 3—4 часов. Перед опытом аскарид несколько раз промывали в теплой стерильной воде, затем по 4—5 самок помещали в стерильную колбу с 150 мл питательной среды следующего состава: NaCl — 0.8%; KCl — 0.02%; CaCl₂ — 0.02%; MgCl₂ — 0.01%; Na₂CO₃ — 0.1%; глюкоза — 0.5%; pH среды — 10.3. Аскарид содержали в течение 24 часов (43 опыта) и 48 часов (19 опытов) в аэробных условиях при температуре +37°. Для подавления микробов мицерин применялся в трех вариантах: 25 000, 50 000 и 100 000 ед. на 150 мл среды (серии 1, 2, 3; см. таблицу). В среде с мицерином аскариды содержались 24 часа. Всего с мицерином проведено 10 опытов. Аналогично 23 опыта были поставлены с колимицином (серии 4, 5, 6). Кроме того, опыты с колимицином ставились на 24 часа с добавлением к среде по 50 000 ед., после чего аскариды перемещались на 24 часа в стерильную среду без антибиотиков (серия 7). 9 опытов были поставлены так, что первые 24 часа аскариды содержались в среде с колимицином, а затем перемещались в среду с мицерином (50 000 ед. каждого из антибиотиков на 150 мл среды, серия 8).

Последние 10 опытов ставились на 24 часа с добавлением к среде одновременно колимицина и мицерина по 50 000 ед. на 150 мл среды (серия 9). Учитывая возможность роста грибковых культур (Saz and Gerzon, 1960; Ellison et al., 1960; Грант, Лаздыня, Пушкарев, 1965), во всех сериях опытов к среде содержания аскарид добавлялся нистатин по 50 000 ед. на 150 мл. Каждая серия опытов сопровождалась контрольными опытами (всего 13).

После 24 часов производилась бактериологическая проверка питательной среды и кишечного тракта паразитов. Посевы были сделаны на мясо-пептонном бульоне и на мясо-пептонном агаре. Исследование микрофлоры кишечного тракта аскарид проводилось в асептических условиях при удалении кишечного тракта и измельчении его стерильными ножницами. Полученная масса пересевалась на мясо-пептонный бульон и агар. С посевов были выделены чистые культуры, выявлены их биохимические свойства и определены виды микробов.

Выделенные микробные культуры проверялись на чувствительность к антибиотикам: колимицину, мономицину, левомицетину, биомицину, стрептомицину, тетрациклину, тетрациклину и нистатину. Чувствительность к этим антибиотикам проверялась на мясо-пептонном агаре при помощи бумажных дисков. Чтение результатов производилось после 24-часового пребывания чашек в термостате при температуре +37°.

Результаты применения антибиотиков для подавления микрофлоры аскарид при содержании их in vitro

№ серии	Микрофлора	Применяемые анти- биотики в ед. на 150 мм среды *	Длитель- ность опытов (в час.)	Результаты исследования сред содержания и аскарид						
				число исследо- ванных сред	число стериль- ных сред	выделен- ная микро- флора	число исследован- ных аскарид	число стерильных аскарид		выделенная микрофлора
								всего	в %	
1	Escherichia coli. Enterococcus sp.	} Мицерин 25 000 Мицерин 50 000 Мицерин 100 000 Всего	24	3	3	—	3	1	—	Escherichia coli.
2	Pseudomonas aeruginosa. Proteus vulgaris.		24	5	5	—	7	6	—	» »
3	Escherichia coli. Pseudomonas aeruginosa.		24	2	1	E. coli.	6	1	—	» »
4	Escherichia coli. Pseudomonas aeruginosa.	} Колимицин 25 000 Колимицин 50 000 Колимицин 100 000 Всего	24	3	3	—	3	1	—	Escherichia coli.
5	Escherichia coli. Proteus vulgaris. Pseudomonas aeruginosa.		24	13	10	E. coli.	25	17	—	То же и Proteus vulgaris.
6	Escherichia coli. Pseudomonas aeruginosa.		24	7	5	E. coli.	19	14	—	Escherichia coli.
7	Escherichia coli.	Колимицин 50 000 Вторые 24 часа в стерильной среде без анти- биотиков Колимицин 50 000 Мицерин 50 000 Колимицин 50 000 Мицерин 50 000	24 24 } 48 24 24 } 48 24	23	18	—	47	32	68.0	Escherichia coli.
8	Escherichia coli. Enterococcus sp.			10	10	—	20	14	70.0	
9	Escherichia coli.			9	9	—	18	16	88.8 { 90.0	

* Во всех опытах, кроме указанных антибиотиков, к среде содержания аскарид добавлен нистатин (50 000 ед. на 150 мл).

Чувствительность микроорганизмов определялась по размерам диаметра стерильной зоны. Согласно инструкции, резистентные микробы растут до самого края диска, малочувствительные — 15 мм до него, чувствительные — 15—25 мм, высокочувствительные превышают 25 мм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В 13 контрольных опытах при исследовании среды содержания и кишечного тракта 26 аскарид выделены *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Enterococcus* sp. и *Pseudomonas aeruginosa*. Однако не во всех опытных сериях найдена вся перечисленная микрофлора, за исключением *Escherichia coli*, который высеян из всех контрольных сред и кишечного тракта аскарид, культивируемых в этих средах.

Данные о микрофлоре аскарид, полученные нами, согласуются с литературными данными (Erps et al., 1950; Cavier, Savel, 1953; Araullo-Cruz, 1965). Все выделенные культуры бактерий при проверке по отношению к антибиотикам оказались чувствительными или даже высокочувствительными к колимицину и мицерину, стерильная зона колебалась от 18 до 28 мм. В то же время другие, проверенные нами антибиотики — левомицетин, пенициллин, стрептомицин, биомицин, тетрациклин, тетрамин и нистатин — действуют слабо или совсем не оказывают влияния. Как показали наши предыдущие исследования (Грант, Лаздыня, Пушкарев, 1965), чувствительным является и мономицин, но бывают случаи, когда выделяются культуры *Escherichia coli*, устойчивые к этому препарату.

Чувствительность выделенной нами микрофлоры к пенициллину, стрептомицину и другим антибиотикам отсутствует. Получение (Erps et al., 1950; Ishizaki et al., 1958; Saz and Gerzon, 1962; Ueno, 1960; Ellison et al., 1960) хороших результатов с этими антибиотиками, по всей вероятности, объясняется образованием резистентности у микробов. По нашему мнению, в каждой географической зоне перед постановкой опытов необходимо проверить состав микрофлоры, а также ее чувствительность к антибиотикам.

Поскольку, по нашим предварительным данным, колимицин и мицерин оказались самыми эффективными препаратами для подавления микрофлоры, присущей аскаридам, в дальнейшем мы содержали аскарид в среде с добавкой этих антибиотиков в комбинации с нистатином.

При содержании аскарид с добавлением мицерина и нистатина (серии 1, 2, 3, см. таблицу) только из одной среды выделен *E. coli*, а при проверке содержимого кишечника аскарид (16 особей) *E. coli* найден у 8 паразитов. Как видно из таблицы, повышение дозы антибиотика от 50 000 до 100 000 ед. не оказывает действия на рост микрофлоры. Именно поэтому результаты по применению мицерина в присутствии нистатина объединены.

В опытных сериях (4, 5, 6) с применением колимицина и нистатина (23 опыта) из четырех сред выделена *E. coli*. При проверке содержимого кишечника 47 аскарид в 15 случаях высеяна также *E. coli* и в двух — еще *Proteus vulgaris*. Увеличение дозы колимицина до 100 000 ед. также не влияет на рост микробов. Поэтому в качестве оптимальной дозы в дальнейших опытах мы избрали 50 000 ед. антибиотика на 150 мл питательной среды.

В седьмой серии опытов, где аскариды содержались в среде с колимицином и нистатином, бактериологическая проверка сред, произведенная через 24 часа после перемещения аскарид в стерильную среду без антибиотиков, дала отрицательные результаты. Но при проверке 20 аскарид из 6 высеян *E. coli*.

Результаты опытных серий № 4, 5, 6, 7 показывают, что колимицин в большинстве опытов обеспечивает стерильность среды, но примерно 30% аскарид содержат микробы, притом почти только *E. coli*. Возможно, это связано со слабым проникновением антибиотиков в кишечный тракт аскарид.

Лучшие результаты по сравнению с седьмой серией получены при содержании аскарид в среде с колимицином и последовательным перемещением их в среду с мицерином (серия 8). После такого 48-часового содержания аскарид все среды были стерильны, а из 18 проверенных аскарид у одной высеяны *E. coli* и еще у одной *E. coli* и *Enterococcus* sp.

В девятой серии аскариды 24 часа содержались в среде с колимицином, мицерином и нистатином. Все среды были стерильные, и из 20 проверенных аскарид только у двух найдены *E. coli*, т. е. 90% аскарид было без микробов. Необходимо отметить преимущество этой серии по сравнению с предыдущей с точки зрения сроков содержания аскарид. При такой постановке опытов, как в девятой серии, уже через 24 часа аскарид можно перемещать в стерильную среду без антибиотиков и на вторые сутки изучать их биохимические процессы. Это очень важно, поскольку с увеличением времени содержания гельминтов *in vitro* снижается их физиологическая активность.

Нами были поставлены опыты по культивированию бактерий, выделенных из кишечного тракта аскарид, с качественным учетом продуцируемых ими летучих жирных кислот. Для этого микробы культивировались в солевой среде с глюкозой при температуре 36°. При помощи метода хроматографии на бумаге (Puskarevs, 1965) обнаружено, что *E. coli* и *Pseudomonas aeruginosa* выделяют муравьиную и уксусную кислоты; это согласуется с литературными данными (Grove et al., 1929/30; Bernhauer, 1932). Те же кислоты нами были найдены при культивировании *Proteus vulgaris*. Это лишний раз подтверждает необходимость пользования антибиотиками при исследовании продуктов метаболизма гельминтов *in vitro*, несмотря на то что в литературе существуют данные о том, якобы *in vivo* нормальная кишечная микрофлора способствует развитию гельминтов (Stefanski and Przyjalkowski, 1966).

Личных наблюдений о возможном неблагоприятном влиянии колимицина и мицерина на жизнедеятельность аскарид *in vitro* путем подавления бактерий или непосредственно у нас пока нет. В дальнейшей работе следует остановиться на этой проблеме.

ВЫВОДЫ

1. При бактериальном исследовании среды, в которой содержались аскариды (*Ascaris suum*), выделены *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Enterococcus* sp. и *Pseudomonas aeruginosa*. Все упомянутые культуры, за исключением *Pseudomonas aeruginosa*, так же выделены и из кишечного тракта аскарид.

2. Все выделенные культуры чувствительны к колимицину и мицерину.

3. Для подавления микрофлоры в среде содержания и кишечном тракте аскарид целесообразно применять колимицин вместе с мицерином и нистатином. Такая комбинация на 100% обеспечивает стерильность среды и на 90% — стерильность культивируемых аскарид.

Литература

- В е н е д и к т о в И. И. 1962. Белки полостной жидкости аскариды свиньи (*Ascaris suum* Goeze, 1758) при содержании паразитов в условиях белкового голодания. Мед. паразитол. и паразитарн. бол., 31 (6) : 660—664.
- Г р а н т Х. Я., Л а з д ы н я М. А., П у ш к а р е в И. А. 1965. Стерильная среда для культивирования аскарид. Матер. к научн. конф. Всесоюзн. общ. гельминтол., 2 : 76—80.
- П у ш к а р е в И. А. 1965. Хроматографический метод для количественного определения летучих жирных кислот в биологических объектах. Изв. АН ЛатвССР, 3 (242) : 93—99.
- A g a u l l o - C r u z T. P. 1965. Bacteriological study on the gut of *Ascaris lumbricoides*. Acta Med. Philipp., 2 : 7—9.
- B a l d w i n E., M o y l e V. 1947. An isolated nerve-muscle preparation from *Ascaris lumbricoides*. J. Exp. Biol., 23 : 277—291.
- B e r n h a u e r K. 1932. Die Oxydativen Gärungen. Berlin: 188.
- B u e d i n g E., M o s t H. 1953. Helminths metabolism, nutrition and chemotherapy. Ann. Rev. Microbiol., 7 : 295—326.

- C a v i e r R., S a v e l J. 1953. Les conditions de vie de l'ascaris du porc. *Ascaris lumbricoides* Linné 1758, hors de l'organisme de l'hôte en milieu aseptique. *Ann. Sci. nat., Zool.*, 15 : 57—70.
- E l l i s o n T., T h o m s o n W. A., S t r o n g F. M. 1960. Volatile fatty acids from axenic *Ascaris lumbricoides*. *Arch. biochem. biophys.*, 91 (2) : 247—254.
- E p p s W., W e i n e r M., B u e d i n g E. 1950. Production of steam volatile acids by bacteria free *Ascaris lumbricoides*. *J. Infect. Dis.*, 87 : 149—151.
- G r o w e E. W., O l m s t e d W. A., K o e n i g K. 1929. The effect of diet and carharsis on the lower volatile fatty acids in the stools of normal man. *J. Biol. Chem.*, 85 : 127—136.
- I s h i z a k i T., B a n d o T., K o b a y a s h i Y. 1958. The studies on the fluid environment of *Ascaris* : influence of pH and effect of antibiotics and antimycotics (dehydroacetic) in fluid media upon the survival length and the duration of normal locomotion. *Jap. J. Med. Sc. a. Biol. (Tokyo)*, 11 (4) : 223—233.
- S a z H. J., G e r z o n K. 1962. Identification of α -methyl-valerate as a product of *Ascaris lumbricoides* fermentation. *Exp. Parasitol.*, 12 : 204—210.
- S t e f a n s k i W., P r z y j a k o w s k i Z. 1966. Effect of alimentary tract microorganisms on the development of *Trichinella spiralis* in Mice. Part. 2. *Exp. Parasitol.*, 18 (1) : 92—98.
- U e n o Y. 1960. A method for the microdetermination of lower aliphatic fatty acids by paper chromatography. *J. Biochem. (Tokyo)*, 48 (2) : 161—168.

ASEPTIC MEDIUM FOR MAINTAINING ASCARIDS (*ASCARIS SUUM*) IN VITRO

I. A. Pushkarev, M. A. Lazdynja and Kh. Ja. Grant

S U M M A R Y

During studies of the medium on which ascarids (*Ascaris suum*) were maintained the following cultures were isolated: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris* and *Enterococcus* sp.

All isolated cultures were sensitive to colimicin and micerin. To inhibit the microflora in the medium and in the intestinal tract of ascarids it is expedient to use colimicin together with micerin and nistatin. Such combination provides for 100 per cent sterility of the medium and 90 per cent sterility of the intestine of the cultivated ascarids.
